

PATENT COOPERATION TREATY

EO/US
PCT/CN99/00126

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

09 March 2000 (09.03.00)

International application No.:

PCT/CN99/00126

Applicant's or agent's file reference:

IP99017

International filing date:

26 August 1999 (26.08.99)

Priority date:

26 August 1998 (26.08.98)

Applicant:

WEI, Qun et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

16 December 1999 (16.12.99)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Q2
PCT世界知识产权组织
国际局

按照专利合作条约(PCT)所公布的国际申请

(51) 国际专利分类号: A61K 38/48, C12N 15/57		A1	(11) 国际公布号: WO00/12120
			(43) 国际公布日: 2000年3月9日(09.03.2000)
(21) 国际申请号: PCT/CN99/00126			(81) 指定国: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
(22) 国际申请日: 1999年8月26日(26.08.1999)			
(30) 优先权: 98117642.9 1998年8月26日(26.08.1998) CN			
(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 北京师范大学(BEIJING NORMAL UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国北京市新街口外大街19号, 邮政编码:100875, Beijing (CN)。			
(72) 发明人;及 (75) 发明人/申请人(仅对美国): 魏群(WEI, Qun) [CN/CN]; 严明山(YAN, Mingshan) [CN/CN]; 高钦山(GAO, Qingshan) [CN/CN]; 姜国华(JIANG, Guohua) [CN/CN]; 连慕兰(LIAN, Mulan) [CN/CN]; 陈燕(CHEN, Yan) [CN/CN]; 中国北京市新街口外大街19号北京师范大学生物化学及分子生物学系, 邮政编码:100875, Beijing (CN)。			
(74) 代理人: 中科专利商标代理有限责任公司(CHINA SCIENCE PATENT & TRADEMARK AGENT LTD); 中国北京市海淀区海淀路80号中科大厦16层, 邮政编码:100080, Beijing (CN)。			本国际公布: 包括国际检索报告。
(54) Title: A PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING CALCINEURIN B SUBUNIT			
(54) 发明名称: 含有钙调神经磷酸酶B亚基的药物组合物			
(57) Abstract <p>The invention provides a pharmaceutical composition for treatment of mammal disease by regulating immune system, which contains CaNB subunit and/or its functional derivant in effective amount for treating the disease.</p>			

(57) 摘要

本发明提供了一种通过调节免疫系统治疗哺乳动物疾病的药物组合物，它含有治疗这种疾病有效量的 CaNB 亚基和/或其功能衍生物。

以下内容仅供参考

在按照PCT所公布的国际申请小册子首页上所采用的PCT成员国国家代码如下：

AE 阿拉伯联合酋长国	DK 丹麦	KP 朝鲜民主主义人民共和国	RO 罗马尼亚
AG 安提瓜和巴布亚	DM 多米尼加	KR 韩国	RU 俄罗斯联邦
AL 阿尔巴尼亚	DZ 阿尔及利亚	KZ 哈萨克斯坦	SD 苏丹
AM 亚美尼亚	EE 爱沙尼亚	LC 圣卢西亚	SE 瑞典
AT 奥地利	ES 西班牙	LJ 列支敦士登	SG 新加坡
AU 澳大利亚	FI 芬兰	LK 斯里兰卡	SI 斯洛文尼亚
AZ 阿塞拜疆	FR 法国	LR 利比里亚	SK 斯洛伐克
BA 波斯尼亚-黑塞哥维那	GA 加蓬	LS 莱索托	SL 塞拉利昂
BB 巴巴多斯	GB 英国	LT 立陶宛	SN 塞内加尔
BE 比利时	GD 格拉纳达	LU 卢森堡	SZ 斯威士兰
BF 布基纳法索	GE 格鲁吉亚	LV 拉托维亚	TD 乍得
BG 保加利亚	GH 加纳	MA 摩洛哥	TG 多哥
BJ 贝宁	GM 冈比亚	MC 摩纳哥	TJ 塔吉克斯坦
BR 巴西	GN 几内亚	MD 摩尔多瓦共和国	TM 土库曼斯坦
BY 白俄罗斯	GR 希腊	MG 马达加斯加	TR 土耳其
CA 加拿大	GW 几内亚比绍	MK 前南斯拉夫马其顿共和国	TT 特立尼达和多巴哥
CF 中非共和国	HR 克罗地亚	ML 马里	TZ 坦桑尼亚
CG 刚果	HU 匈牙利	MN 蒙古	UA 乌克兰
CH 瑞士	ID 印度尼西亚	MR 毛里塔尼亚	UG 乌干达
CI 科特迪瓦	IE 爱尔兰	MW 马拉维	US 美国
CM 喀麦隆	IL 以色列	MX 墨西哥	UZ 乌兹别克斯坦
CN 中国	IN 印度	NE 尼日尔	VN 越南
CR 哥斯达黎加	IS 冰岛	NL 荷兰	YU 南斯拉夫
CU 古巴	IT 意大利	NO 挪威	ZA 南非
CY 塞浦路斯	JP 日本	NZ 新西兰	ZW 津巴布韦
CZ 捷克共和国	KE 肯尼亚	PL 波兰	
DE 德国	KG 吉尔吉斯斯坦	PT 葡萄牙	

含有钙调神经磷酸酶 B 亚基的药物组合物

所属技术领域

本发明涉及含有钙调神经磷酸酶 B 亚基(CaNB)的药物组合物。

5 现有技术

钙调神经磷酸酶(Calcineurin, CaN)是目前所知唯一依赖钙, 钙调素(calmodulin, CaM)的蛋白磷酸酶。70 年代末, 80 年代初首先在哺乳动物脑内发现并得到纯化。后来在人, 兔的非神经组织乃至某些肿瘤细胞中均有发现。CaN 的分子量是 80 KD, 由催化亚基 A(61KD)和调节亚基 B(19KD) 按 1: 1 组成。(Klee, C B et al., The calmodulin regulated protein phosphatase molecular aspects of cellular regulation, 1988, Vol 5, p225)。

CaN A 亚基是全酶催化和调节的核心。生物化学研究表明, 它至少包含了 4 个结构域: 与金属离子的结合区(或催化区), 与调节亚基 B(CaNB)的结合区, 与调节剂 CaM 的结合区及自抑制区。催化部位在 A 亚基上的最有力证据是: 将 A, B 二亚基分离后, A 亚基仍表现出蛋白磷酸酶的活性。CaN 在蛋白磷酸酶分类中属丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶。命名为蛋白磷酸酶 2B, 其催化亚基 A 和此家族的其他成员特别是蛋白磷酸酶 1, 2A 等有很高的同源性。这主要发生在它们的催化区域, 因此它们的催化机制极其相似。但每种磷酸酶有着不同的调节区域和亚基, 因而产生出结构和功能的差异。CaNA 亚基与其他磷酸酶不同的是它的 C 末端多出 170 个氨基酸序列, 此序列为 B 亚基结合区, CaM 结合区和自抑制区, 它们都与调节 CaN 磷酸酶的活性有关。

20 人的 CaN B 亚基由 169 个氨基酸组成, 它是钙结合蛋白家族中的一员, 其一级结构与 CaM, 肌钙蛋白 C 等非常相似, 与 CaM 的序列有 31% - 35% 的同源性。并也有 4 个 EF 手的钙结合区域。钙离子结合区的氨基酸序列有更为高度的保守性。CaN B 亚基与 CaM 的空间结构也极其相似, 都包括了两个球型的, 分别含有 2 个结合钙的结构域和连接两个结构域的中心 α 螺旋。与 CaM 不同的是 CaM 的两个球型钙结构域位于中心 α 螺旋的两侧, 而 CaNB 亚基的两个球型钙结构域通过中心螺旋在 85 位甘氨酸处发生急剧转变, 连同 C 末端的 β 链形成了一个疏水凹槽。使这两个球型钙结构域覆盖在其上侧, 而 CaNA 亚基的 B 亚基结合中心螺旋(BBH)中的疏水氨基酸就结合在这个疏水凹槽中, 成为 CaN A, B 二亚基结合的结构基础。(Kissinger, CR et al., Nature, 1995, 378: 641; Griffith, JP et al., Cell, 1995, 82: 507)。另一个与 CaM 不同的是
30 CaNB 亚基 N 末端的甘氨酸上连接有一个十四碳的脂肪酰基团。B 亚基不具有蛋白

磷酸酶的活力,但对于维持 CaN 酶活性是高度专一的。虽然 CaNB 亚基和 CaM 对 CaNA 亚基的活性具有协同调节作用,但二者对酶活力的调节是不可互相代替的。目前所知最主要的一点是: B 亚基通过降低催化亚基 A 对底物的 K_m 来调节 CaN 的活性。(Perrino, BA et al., J. Biol. Chem., 1996, 270: 340)。

5 CaN 是保守蛋白,广泛分布在真核生物中。从人,大鼠,小鼠,猪,蛙,鱼,鸡等的脑匀浆中以及人,兔等的非神经组织中均检出了 CaN。从果蝇胚囊粗提物中检出了 B 亚基,但没有检出 A 亚基。在海胆卵中发现了一种受 CaM 调节的蛋白磷酸酶,它与 CaN 有着相同的亚基组成,它的小亚基与 CaN 的 B 亚基有着相似的肽图谱,但它的大亚基肽图谱与 CaNA 亚基的肽图谱不同 (Klee, CB et al., Adv. Enzymol., 1987, 10 61: 149)。表明 B 亚基比 A 亚基更具保守性。

我们曾用小鼠 CaN 抗体检测人脑及其他肿瘤中的 CaN,结果发现,在我们检测的一些肿瘤如人脑胶质瘤,脑膜瘤等中均有 B 亚基的存在,含量还相当可观。但 A 亚基很不明显。小鼠 H22 肝癌腹水中 CaNA, B 二亚基均能检测到,但 B 亚基量大于 A 亚基。(魏群等,生物化学杂志,1993, 9: 240)。CaN 在肿瘤组织中的存在和作用还值得进一步研究和探讨。

从分子生物学研究来看,已经从人,大鼠,小鼠,兔脑等组织的基因文库中分离到几个 CaN cDNA 克隆,真核组织中 CaNA 有 3 种基因编码,分别命名为 CaNA α , β , γ 。其中 A α , A β 分别定位在人类 4 号和 10 号(10q21-q22)染色体上, CaNB 亚基高度保守,目前只发现一种 CaNB 基因,定位于人的 2 号染色体(2p16-p15)上。(Wang, 20 MG et al., Cytogenet. Cell Genet., 1996, 72: 236)。

CaNA, B 两亚基哺乳动物的 cDNA 虽早在 80 年代末,90 年代初就已经问世,但在大肠杆菌中如何表达出高含量,有活性的酶却迟迟不能解决,有在昆虫细胞或其他细胞中表达的,有表达出来以包涵体形式存在的,纯化步骤繁杂,得率很少。或 A, B 两亚基共同表达。而我们进行了 CaNA, B 两亚基在大肠杆菌中的分别表达,尤其是 CaNB 亚基的表达量极大,纯化步骤极其简单。人 CaNB 亚基和大鼠,牛等哺乳动物均同源,这些均为 CaNB 亚基的药用奠定了坚实的基础。

CaN 有许多重要的生物学功能。由于它是唯一依赖钙,钙调素的蛋白磷酸酶,所以在钙离子信号传递涉及其底物可逆磷酸化的生理,病理过程中都起着重要的作用。又因 CaN 在脑内的极高含量,许多脑内功能都与之有关。目前最引人注目的是它和学习记忆,老年性痴呆等的关系。最近发现 CaN 又是 T 细胞活化中的关键酶。

CaN 是 T 细胞活化中关键酶的证据是证明了它是不同免疫抑制药物如 FK506, 环胞霉素 A 等的体内共同靶酶, 而且已研究了它在 T 细胞活化中的作用。研究表明转录因子 NF-AT 是 CaN 的底物, 而且证明了 CaN 和 NF-AT 是结合成复合物从胞浆转移到核内的(Shibasaki, F et al., Nature, 1996, 382: 370)。NF-AT 在核内的作用已很清楚, 它结合于白介素 2(IL-2)基因 启动子区, 促使 IL-2 的转录表达, IL-2 再从细胞中分泌出来, 结合于 T 细胞表面的 IL-2 受体, 从而刺激 T 细胞的增殖。

目前进行的 CaN 生物功能研究都是基于 CaN 具有蛋白磷酸酶活性这一特性, 进行的实验大部分是在 CaNA, B 二亚基共同参与下完成的, 少数实验是在 CaNA 亚基或 CaNA 亚基的突变体单独存在时完成的。。有论文对 CaNB 亚基在完成生物功能中的作用有所论述, 特别是免疫抑制剂 FK506 和 FKBP-12 及环胞霉素 A 和其结合蛋白与 CaN 结合时有人认为 B 亚基起了重要作用(Li, W et al., J. Biol. Chem., 1993, 268: 14040; Milan D, et al., Cell, 1994, 79: 437; Kawamura A et al., J. Biol. Chem., 1995, 270: 15463; Griffith, JP et al., Cell, 1995, 82: 507), 但认为在此作用中仍需要 CaNA 的参与。目前为止没有看到用 CaNB 亚基单独注入体内产生生理效应的报导, 更没有看到 CaNB 亚基能作为抗癌药及生物反应调节剂的报导。

机体免疫状态与肿瘤发生发展有着密切的关系, Burnet 于 1970 年提出免疫监视的概念。其主要论点是: “免疫功能部分是作为阻止体细胞突变产生癌细胞的机制而进化的。” 即哺乳动物主要是通过 T 淋巴细胞来识别和消灭体内癌变的。近年来关于人及动物肿瘤的抗原性, 抗肿瘤效应细胞以及肿瘤细胞逃避机体免疫监视等研究有了进一步的进展, 表明机体对发挥免疫监视作用的效应细胞除 T 细胞外, 还有其他细胞的参与, 抗肿瘤的免疫功能除针对肿瘤相关抗原外, 也可对癌细胞的其他异常表现产生反应, 并认为, 机体免疫功能受损则易患肿瘤。而且目前研究表明, 免疫功能的受损主要是由于免疫调节失常引起的。

近代免疫学进展告诉我们, 包括人类在内的一切动物, 它们的免疫功能是由一个极其复杂而又十分精确的调节系统来调节的, 称为免疫调节网络。在这个免疫调节网络中, 除神经系统和内分泌系统的调节因素外, 就免疫系统本身, 按其功能可分为两类: 一类调节细胞及其产物能增强免疫反应, 称向上调节, 另一类调节细胞及其产物是降低免疫反应的称为向下调节。正常机体的免疫系统就依赖于向上和向下调节的机制对来自体内外的各种刺激作出精确的反应, 并维持机体的免疫功能处于动态平衡之中。如果由于某种原因如肿瘤生长, 或衰老, 病毒, 慢性感染, 化疗等因素的影响,

干扰或破坏调节的平衡，使免疫功能低下。如我们能使他们的免疫功能向上调节，就必然有利于这些疾病的控制和改善。免疫调节药物就是从不同的侧面通过调节机体的免疫功能而发挥治疗作用的。其中我们把来自生物体本身的一类免疫调节物质叫生物反应调节剂。

- 5 基础研究表明，CaN 是 T 细胞活化中的关键酶，也是现知免疫抑制药物 FK506，环孢霉素 A 的体内靶酶，CaNB 亚基在免疫抑制剂和其结合蛋白与 CaN 结合时起了重要作用。CaNB 亚基的保守性很强，人，牛，大鼠等哺乳动物 CaNB 亚基的氨基酸序列均相同。

本发明详述

- 10 本发明的目的是提供一种通过调节免疫系统治疗哺乳动物疾病的药物组合物，它含有有效量的 CaNB 亚基。

所述药物组合物可含有药学上可接受的载体和/或赋形剂。

- 15 所述的哺乳动物疾病是指可通过调节哺乳动物的免疫反应得到治疗的疾病，例如，肿瘤，病毒慢性感染，衰老，放疗等使免疫功能低下，及其它一些由于免疫功能紊乱造成的疾病。

所说的哺乳动物可以是人，小鼠等。治疗小鼠体内肿瘤的有效量为每只小鼠 10-200 μ g/天(或人的临床剂量为 100-2000 μ g/kg 体重/天)，施用一次或多次。对施用途没有特别限制，可以是静脉内，腹膜内等，并且最好是连续多天施用。

本文所述的 CaNB 亚基具有如下的氨基酸序列：

- 20 1 GNEASYPLEM CSHFDADEIK RLGKRFFKKLD LDNSGSLSV EFMSPPELQQ
51 NPLVQRVIDI FDTDGNGEVD FKEFIEGV SQ FSVKGDKEQK LRFAFRIYDM
101 DKDGYISNGE LFQVLKMMVG NNLKDTQLQQ IVDKTIINAD KDGDGRISFE
151 EFCVVVGGLD IHKKMVVDV

- 25 上述序列中一个或多个氨基酸残基的加入，缺失或替换，或者一个或多个氨基酸侧链的化学修饰后的功能衍生物，只要它基本上保留了 CaNB 亚基生物学活性也可以用于本发明的药物组合物中。

- 30 我们的体外实验结果表明，CaNB 亚基直接作用于大鼠脾淋巴细胞，能使之增殖 4-7 倍，并与有丝分裂原 Con. A 对淋巴细胞的刺激有明显的协同作用，62.5mg CaNB 亚基能使可的松的免疫抑制效应逆转 88%。小鼠体内实验也表明 CaNB 亚基能刺激重

要免疫器官脾的增生, 显示了 CaNB 亚基是一种较好的向上调节免疫功能的免疫调节药物或生物反应调节剂。

CaNB 亚基的体内抗肿瘤作用表现尤为明显, 能明显减少 H22 腹水肝癌小鼠的腹水生长, 并使荷瘤小鼠生命延长 50-83%, 同样剂量的 CaNB 亚基能使 S180 实体瘤抑制 57% 以上, 与对照组相比, 结果均具有显著差异。

CaNB 亚基的小鼠急性毒性实验表明, 其毒性较小。用有效剂量的 4-50 倍进行小鼠急性毒性实验, 被试小鼠 24 小时内均无一只死亡。

本发明是建立在我们已完成了有活性的人 CaNB 亚基在大肠杆菌中大量表达和纯化的基础上将其单独直接药用的结果, 并进行了 CaNB 亚基及功能衍生物的应用工作。

实施例

实施例 1 CaNB 亚基质粒的构建和表达:

CaNB 亚基的 cDNA 来自大鼠脑 cDNA 文库(Perrino B et al., J. Biol. Chem., 1996, 270: 340), 通过 5'引物: 5'-CCGCCATATGGGAAATGAGGCGAGTT-3'和 3'引物: 5'-CGCGGGATCCTCACACATCTACCACCA-3'经 PCR 扩增, 在琼脂糖凝胶电泳上分离 PCR 产物, 于 NdeI 和 BamHI 酶切后, 经 T₄ DNA 连接酶装入 pet21a 表达载体, 转化到感受态 E. coli 菌株 BL21(DE3)plysS 中, 保存于含氨苄青霉素 50μg/ml 的 LB 琼脂培养板, 挑取单菌落预培养, 将预培养液加入含 50μg/ml 含氨苄青霉素的 TM 培养基中, 37°C 摇床以 250rpm 保温培养 5-6 小时, 4500rpm, 20 分钟离心, 弃上清, 收获菌体。

实施例 2: CaNB 亚基剪切体及突变体的构建和表达。

CaNB 亚基剪切体及近 N, C 末端突变体的构建采用对所需改变基因特定引物设计后的 PCR 扩增及在琼脂糖凝胶电泳中产物的分离。CaNB 亚基远离 N, C 末端的基因的定点突变, 采用 promega 公司的 pAlter 突变质粒系统进行构建。表达系统同野生型。

实施例 3: CaNB 亚基的制备:

1. 超声破碎菌体: 按 1 升菌体培养液的 1/10-1/20 体积加入缓冲液(20mmol/L tris,

pH7.4, 1mmol/L EDTA, 0.2mmol/L PMSF, 1mmol/L β 巯基乙醇), 然后以输出功率 40% 破碎细胞, 时间为 2-3 分钟。

2. 分离纯化: 破碎后菌体经 100°C 沸水浴 30-40 分钟, 然后经 12000rpm 离心 20 分钟, 取上清, 此为 CaNB 亚基的粗提液。按体积加 3mmol/L CaCl_2 , 1mmol/L β 巯基乙醇和 0.5Mol/L NaCl 后上预先经缓冲液(20mmol/L tris, pH7.4, 0.5mmol/L CaCl_2 1mmol/L β 巯基乙醇,)平衡的 Phenel-Sepharose CL-4B 层析柱, 再用同样的缓冲液洗尽杂蛋白, 最后用缓冲液 20mmol/L tris, pH7.4, 1mmol/L EGTA, 0.5mmol/L DTT 洗脱, 每升菌液可得电泳纯 CaNB 亚基~120mg, 所得产物可冷冻干燥保存。

10 实施例 4: CaNB 亚基的检测鉴定, 质量控制及使用方法:

1. DNA 序列测定: 由 507 个核苷酸组成, 与文献标准人 CaNB 亚基 cDNA 相同。

2. 氨基酸测序: 测序 N 末端 10 个氨基酸为 GNEASYPLRM。证明是人 CaNB 亚基蛋白, 与文献一致。查证大鼠 CaNB 亚基和人 CaNB 亚基序列完全相同。

3. 纯度分析: SDS-PAGE 鉴定, 纯度为 98%以上。

15 4. 物理化学性质鉴定: 等电点 4.8, 光吸收值 $\epsilon_{277\text{nm}}^{1\%}=3.1$

5. 浓度测定: 用紫外分光光度法。

6. 鉴别实验: CanB 亚基抗体免疫印迹阳性, 紫外吸收光谱。

7. 生物活性: 激活 CaNA 亚基。

20 8. 性状及使用方法: CaNB 亚基为水溶性, 水中溶解度大, 水溶液无色, 澄清。可在生理盐水或中性 pH 的缓冲液中(可加甘露醇)冷冻干燥保存 2 年以上, 临用前用少量生理盐水或缓冲液溶解即可。

实施例 5 CaNB 亚基的体内抗肿瘤实验:

1. H22 腹水肝癌防治实验。延长小鼠存活期及剂量试验: BALB/C 小鼠, 雄性, 25 20±1g, 用药组小鼠腹腔分别注射 CaNB 亚基 10, 100, 200 μg /0.2ml/天/只小鼠, 对照组小鼠注射 PBS 0.2ml/天/只小鼠, 2 天后 注射 1×10^6 H22 腹水癌细胞, 同时继续注射 CaNB 亚基和 PBS 共 7 天, 观察小鼠存活期。生命延长率按以下公式计算,

$$\text{生命延长率} = \frac{\text{给药组平均生存天数} - \text{对照组平均生存天数}}{\text{对照组平均生存天数}} \times 100\%$$

5

结果如下:

组别	平均存活天数±标准误	生命延长率	t 测验
对照组	19.5 ± 0.76		
10 10μgCaNB	24.6 ± 3.35	26%	< 0.2
100μgCaNB	29.2 ± 1.36	50%	< 0.001

组别	平均存活天数±标准误	生命延长率	t 测验
对照组	18.75 0.5		
200μgCaNB	34.25 4.6	82.7%	< 0.001

2. 抗 H22 腹水肝癌, 延长小鼠存活期治疗实验: BALB/C 小鼠, 雄性, 20±1g 腹腔注射 1×10^7 H22 腹水癌细胞, 2 天后分二组, 分别注射 CaNB 亚基 200μg/0.2ml/天/只小鼠(给药组)和 PBS 0.2ml/天/只小鼠。(对照组), 观察小鼠存活期。结果如下:

组别	平均存活天数±标准误	生命延长率	t 测验
对照组	19.0 ± 1.6		
15 给药组	29.0 ± 8.9	52.6%	< 0.0 25

20 3. 抗 S180 实体瘤治疗试验: 取 S180 腹水癌小鼠腹水按 1: 3 PBS 稀释后。对每只实验动物昆明种小鼠, 雄性, 20±1g, 于腋窝皮下接种 0.2ml(约 1×10^7 细胞)。接种后随机分组, 第 4 天(大部分瘤已能看到)分别在腹腔注射 PBS 0.2ml/天/只小鼠。(对照组)和 CaNB 亚基 100μg/0.2ml/天/只小鼠(给药组), 共 7 天, 停药 24 小时后处死动物, 解剖剥离瘤块及脾, 并称重, 计算药物对瘤的抑制率。按以下公式计算,

$$\text{肿瘤抑制率} = \frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{给药组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100\%$$

5

结果如下:

组别	平均脾重±标准误	增重率	t 测验	平均瘤重±标准误	抑制率	t 测验
对照组	0.25 ± 0.09			1.38 ± 0.66		
给药组	0.32 ± 0.08	25.5%	< 0.1	0.59 ± 0.39	57.1%	< 0.01

实施例 6: CaNB 亚基的体外细胞免疫实验:

10

1. CaNB 亚基对大鼠脾淋巴细胞增殖的直接影响: 常规无菌分离大鼠脾淋巴细胞, 用 1640 培养液制成 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 细胞悬液, 将细胞 0.2ml 植入 96 孔培养板中(5×10^5 细胞/孔), 加入 CaNB 亚基(0, 2.5, 12.5, 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 37°C, 5%二氧化碳条件下培养 48 小时, 加入 ^3HdR (0.5 $\mu\text{Ci}/\text{孔}$)继续培养 8-16 小时, 用多头细胞收集器将细胞收集到玻璃纤维滤膜上, 烘干后加液闪液, 用液闪计数器测定 cpm 值, 比较给药前后的差异。以增殖倍数表示, 按以下公式计算,

15

$$\text{增殖倍数} = \frac{\text{给药组平均 cpm}}{\text{对照组平均 cpm}} \times 100\%$$

20

结果如下:

剂量	cpm ± 标准误	增殖倍数	t 测验
0 (对照组)	467 ± 81		
2.5 μg CaNB 亚基	375 ± 25		
12.5 μg CaNB 亚基	1704 ± 194	3.7	< 0.001
62.5 μg CaNB 亚基	3041 ± 390	6.5	< 0.001

25

2. CaNB 亚基与有丝分裂原 Con. A 对大鼠脾淋巴细胞增殖的协同作用: 实验方法基本同实施例 6-1, 在 96 孔培养板中加入细胞悬液后, 在加入 CaNB 亚基的同时, 还加入免疫刺激剂, 有丝分裂原 Con. A 5ug/ml, 同上培养后, 观察 CaNB 亚基与有丝分裂原 Con. A 的协同增殖作用。结果如下:

5

剂量	cpm \pm 标准误	增殖率	t 测验
0 (对照组)	158000 \pm 3200		
2.5 μ g CaNB 亚基	155000 \pm 7000		
12.5 μ g CaNB 亚基	174000 \pm 5200	10.2%	< 0.001
62.5 μ g CaNB 亚基	192000 \pm 3600	21.8%	< 0.001

10 3. CaNB 亚基对可的松免疫抑制作用的逆转效应: 实验方法基本同实施例 6-1, 在 96 孔培养板中, 加入细胞悬液后, 先加入免疫刺激剂 Con. A 5ug/ml 和可的松 10^{-7} mmol/L, 然后再加 CaNB 亚基, 反应后观察 CaNB 亚基对可的松免疫抑制作用的逆转效应。结果如下:

剂量	cpm \pm 标准误	增殖逆转率	t 测验
0 (对照组)	66400 \pm 4500		
15 2.5 μ g CaNB 亚基	63500 \pm 2800		
12.5 μ g CaNB 亚基	79300 \pm 4000	19.4%	< 0.001
62.5 μ g CaNB 亚基	125000 \pm 5100	87.9%	< 0.001

实施例 7: CaNB 亚基的小鼠急性毒性实验: 实验动物: BALB/C 小鼠, 雄性, 20 ± 1 g。

20 结果如下:

组别(剂量)	数量	死亡数量		
		0-24 小时	24-48 小时	48 小时-1 个月
正常剂量 4 倍(0.4mg/0.2ml/只小鼠)	4	0	0	0
正常剂量 20 倍(2mg/0.2ml/只小鼠)	4	0	0	0
正常剂量 50 倍(5mg/0.2ml/只小鼠)	8	0	3	0

权 利 要 求

1、一种治疗哺乳动物疾病的药物组合物，它含有治疗这种疾病有效量的 CaNB 亚基和/或其功能衍生物。

5 2、按照权利要求 1 的药物组合物，其特征在于，它是通过调节免疫系统治疗哺乳动物疾病的。

3、按照权利要求 1 所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物还含有药学上可接受的载体和/或赋形剂。

10 4、按照权利要求 1 所述的药物组合物，其特征在于，所述的哺乳动物疾病是一种可通过调节哺乳动物的免疫反应得到治疗的疾病。

5、按照权利要求 3 所述的药物组合物，其特征在于，所述的哺乳动物疾病是肿瘤疾病。

6、按照权利要求 1 所述的药物组合物，其特征在于，所述的哺乳动物是人。

15 7、按照权利要求 1 所述的药物组合物，其特征在于，所述的哺乳动物是小鼠，治疗其体内肿瘤的有效量为每只小鼠 10-200 μ g/天。

8、钙调神经磷酸酶 B 亚基在制备治疗哺乳动物疾病的药物中的应用。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN99/00126

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁶ : A61K38/48,C12N15/57

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched

Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
A	WO 96/35126 7 November 1996 see the whole document.	1-8
A	JP06-181778 5 July 1994 see the whole document.	1-8
A	WO 93/03364 18 February 1993 see the whole document.	1-8
A	WO96/12806 2 May 1996 see the whole document.	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason(as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20.SEP.1999 (20.09.99)

Date of mailing of the international search report

30 SEP 1999 (80.09.99)

Name and mailing address of the ISA/

The Chinese Patent Office
6, Xitucheng Road, Haidian District,
Beijing, 100088, China

Facsimile No. 86-010-62019451

Authorized officer ZENG,Fanhui

Telephone No. 86-010-62093733

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN99/00126

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
WO 96/35126	07. 11. 96	EP0830606	25. 03.98
JP06-181778	05.07.94	none	
WO93/03364	18.02.93	US5362629	08.11.94
WO9612806	02.05.96	AU4006695	15.05.96
		US5723436	03.03.98

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN99/00126

A. 主题的分类

Int.Cl⁶:A61K38/48, C12N15/57

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI,EPODOC

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
A	WO96/35126 1996 年 11 月 7 日 见全文	1 - 8
A	JP06-181778 1994 年 7 月 5 日 见全文	1 - 8
	WO93/03364 1993 年 2 月 18 日 见全文	1 - 8
	WO96/12806 1996 年 5 月 2 日 见全文	1 - 8

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A” 明确表示了一般现有技术、不认为是特别相关的文件

“E” 在先文件, 但是在国际申请日的同一日或之后公布的

“L” 对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件

“P” 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件

“T” 在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

“X” 特别相关的文件; 当该文件被单独使用时, 要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性

“Y” 特别相关的文件; 当该文件与其他一篇或多篇这类文件结合在一起, 这种结合对本领域技术人员是显而易见的, 要求保护的发明不能认为具有创造性

“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

20.09 月 1999(20.09.99)

国际检索报告邮寄日期

30. 9月 1999 (30.09.99)

国际检索单位名称和邮寄地址

中国专利局

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号:

86-010-62019451

受权官员

曾繁辉

电话号码: 86-01-62093733

国际检索报告
同族专利成员的情报

国际申请号

PCT/CN99/00126

检索报告中引用的专利文献	公布日期	同族专利成员	公布日期
WO 96/35126	07.11.96	EP0830606	25.03.98
JP06-181778	05.07.94	无	
WO93/03364	18.02.93	US5362629	08.11.94
WO96/12806	02.05.96	AU4006695	15.05.96
		US5723436	03.03.98